

# Exhibit 4

English Translation of Title and Abstract, from AU 44413/93:

Granulocyte-binding antibody constructs, their preparation and use

The present invention describes granulocyte-binding antibody constructs, which were derived from the monoclonal mouse antibody MAk BW 250/183, as well as a process for their preparation and their use.



⑮ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 42 25 853 A 1**

⑤① Int. Cl.<sup>5</sup>:  
**C 07 K 15/28**  
A 61 K 39/395  
A 61 K 49/00  
C 12 N 15/11

⑲ Aktenzeichen: P 42 25 853.7  
⑳ Anmeldetag: 5. 8. 92  
㉑ Offenlegungstag: 10. 2. 94

⑦① Anmelder:  
Behringwerke AG, 35039 Marburg, DE

⑦② Erfinder:  
Seemann, Gerhard, Dr., 3550 Marburg, DE; Bosslet,  
Klaus, Dr., 3550 Marburg, DE

⑤④ Granulozytenbindende Antikörperfragmente, ihre Herstellung und Verwendung

⑤⑦ Die vorliegende Erfindung beschreibt schwere und leichte Antikörperketten mit Spezifität für NCA 95, die von dem monoklonalen Maus-Antikörper BW 250/183 abgeleitet wurden, sowie ein Verfahren zu seiner Herstellung und seine Verwendung in Therapie und Diagnostik.

DE 42 25 853 A 1

DE 42 25 853 A 1

## DE 42 25 853 A1

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung beschreibt granulozytenbindende Antikörperfragmente, die von dem monoklonalen Mausantikörper MAK BW 250/183 (EP-A1-0 388 914) abgeleitet wurden, sowie ein Verfahren ihrer Herstellung und ihre Verwendung.

Der monoklonale Antikörper MAK BW 250/183 ist ein monoklonaler Mausantikörper des IgG1-Kappa Typs, der gegen das "nonspecific crossreacting antigen" (NCA) 95 und gegen das carcinoembryonale Antigen (CEA) gerichtet ist und keine unerwünschten Kreuzreaktionen mit menschlichen Normalgeweben außer der Colon mucosa hat. Seine Bindung an Granulozyten und Granulozytenvorläufer im Knochenmark ermöglicht auch eine in vivo Anwendung.

Bei der Anwendung von monoklonalen Antikörpern (MAK) für die in vivo Therapie beim Menschen kommen im allgemeinen Antikörper zum Einsatz, die aus Nagern vor allem aus Mäusen isoliert wurden. Die wiederholte Applikation hoher Dosen von Antikörpern nicht menschlichen (xenogenen) Ursprungs bei der in vivo Therapie kann jedoch zu einer Immunreaktion der Patienten führen. Sie entwickeln nach etwa 10—14 Tagen humane anti-Maus Immunglobulin-Antikörper (HAMA). Eine solche Therapie muß nach 10 Tagen abgebrochen werden und kann nicht wieder aufgenommen werden.

Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden ist es mittlerweile gelungen, die xenogenen Antikörper so zu verändern, daß sie für den Menschen nicht mehr oder nur noch sehr schwach immunogen sind und trotzdem ihre Antigenbindungsfähigkeit behalten. In einem ersten Schritt wurden dabei in den Genen, die für die H- und L-Ketten der xenogenen MAK kodieren die konstanten Exons (CH1, CH2, CH3, CL) gegen Exons aus menschlichen Immunglobulingen ausgetauscht (Boulianne, G.L., Nobumichi Hozumi, and Marc J. Shulman (1984) Nature 321, 643—646). Auf diese Weise erhält man sogenannte chimäre Antikörper, die aus variablen Domänen xenogenen Ursprungs und menschlichen konstanten Bereichen bestehen. Diese chimären Antikörper enthalten noch etwa 30% xenogene Proteinsequenzen, so daß bei ihrer Verwendung in der Immuntherapie noch immer eine wenn auch schwächere Immunreaktion der Patienten zu erwarten ist (Brüggemann, M., Greg Winter, Herman Waldmann, and Michael S. Neuberger (1989) J. Exp. Med. 170, 2153—2157).

Um die Immunogenität von xenogenen Antikörpern weiter zu reduzieren, wurden von G. Winter und M. Neuberger 1986 eine Technik entwickelt, bei der nur die CDR-Loops der VL- und VH-Domänen der xenogenen Antikörper auf VL- und VH-Domänen von menschlichen Antikörpern übertragen werden (Jones, P. T., Paul H. Dear, Jefferson Foote, Michael S. Neuberger, and Greg Winter (1986) Nature 321, 522—525), ein Vorgang der als "Humanisierung" bezeichnet wird und sich auf der Ebene der VH- und VL-Gene abspielt. Die strukturelle Variabilität der VH- und VL-Domänen beschränkt sich im allgemeinen auf die CDR-Loops.

In der vorliegenden Erfindung werden nun Antikörperketten beschrieben, welche spezifisch für menschliche Granulozyten sind und bei denen zumindest die CDR-Regionen der schweren und leichten Ketten vom Maus MAK BW 250/183 stammen (EP-A1-0 388 914). Die übrigen Teile des MAK stammen vorzugsweise von menschlichen Antikörpern.

Die wesentlichen Schritte bei der Humanisierung eines Antikörpers sind im allgemeinen: die Klonierung und Nukleinsäuresequenzanalyse der spezifischen VH- und VL-Gene, den Computer-unterstützten Entwurf der synthetischen Oligonukleotide für die Übertragung der CDR-Loops auf die menschlichen VH- und VL-Domänen und die Übertragung der CDR-Loops auf die menschlichen VH- und VL-Domänen mittels spezifischer Mutagenese (Riechmann, L., Michael Clark, Herman Waldmann, and Greg Winter (1988) Nature 332, 323—327; Verhoeyen, M., Cesar Milstein, and Greg Winter (1988) Science 239, 1534—1536).

Die Durchführung der Humanisierung des MAK BW 250/183 nach dem allgemeinen Verfahren führte nun zu einem humMAK, der eine reduzierte Antigenbindungsstärke im Vergleich zum murinen MAK BW 250/183 hat. Überraschenderweise führte erst der zusätzliche Austausch einer weiteren Aminosäure in der VL-Domäne zu einem humMAK, der ähnliche Antigenbindungseigenschaften wie der Maus MAK BW 250/183 hat.

Gegenstand der Erfindung ist daher eine mutagenisierte variable Domäne der humanisierten leichten Kappa-Kette gemäß Tabelle 1c ("CDR-grafted" leichte Antikörperkette) und eine variable Domäne der humanisierten schweren Kette gemäß Tabelle 1a bzw. deren funktionell äquivalente Varianten davon ("CDR" steht für "Complementary Determining Regions"). Unter funktionell äquivalente Varianten versteht man im Sinne der Erfindung im allgemeinen Varianten der erfindungsgemäßen leichten bzw. schweren Antikörperketten, die an NCA 95 und CEA binden, jedoch nicht an menschlichen Normalgeweben außer der Colon mucosa, die spezifisch an menschliche Granulozyten bzw. Granulozytenvorläufer binden und die eine im Vergleich zum korrespondierenden Maus MAK ähnlich Affinität zum Antigen besitzen, die vorzugsweise nicht um den Faktor ca. 10, insbesondere ca. 5, vor allem ca. 0,5 zum korrespondierenden Maus MAK abweicht.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein molekulares Konstrukt, bestehend aus der Aminosäurekette gemäß Tabelle 1a oder 1c und weitere mit den genannten Sequenzen verknüpfte Aminosäureketten, wobei diese Aminosäureketten verschieden von den erfindungsgemäßen Sequenzen und vorzugsweise Teile eines humanen Antikörpers sind, beispielsweise Teile der konstanten Bereiche der schweren und leichten Ketten. Die weiteren molekulare Konstrukte sind beispielsweise single domain Fragmente oder single chain Fragmente.

Die vorliegende Erfindung umfaßt auch humanisierte monoklonale Antikörper (humMAK) oder funktionell aktive Teile davon, die die erfindungsgemäßen leichten Antikörperketten und schweren Antikörperketten enthalten. Funktionell aktive Teile davon sind beispielsweise F(ab)- oder F(ab')-Fragmente mit einer oder mehreren Hinge-Regionen.

Ferner können die erfindungsgemäßen molekularen Konstrukte oder die erfindungsgemäßen humMAK Effektor- oder Reportermoleküle enthalten, beispielsweise ein Chelat zur Komplexbildung mit Metallionen (z. B. EDTA, DTPA), ein Toxin (z. B. Ricin), eine zweite Binderegion anderer Spezifität bzw. mit katalytischen Eigenschaften und/oder ein Enzym. Als Enzyme sind alle im menschlichen Organismus nicht vorkommenden Enzyme,

## DE 42 25 853 A1

wie beispielsweise die  $\beta$ -Lactamase oder die Carboxipeptidase bevorzugt. Von den im menschlichen Organismus vorkommenden Enzymen können im allgemeinen die Enzyme verwendet werden, die extrazellulär vorzugsweise in geringen Konzentrationen vorkommen, wie beispielsweise alle lysosomalen Glucuronidasen oder alle Sialidasen, vorzugsweise die humane Sialidase, die bevorzugt das Sialyl Lew<sup>x</sup> Epitop zu Lew<sup>x</sup> modifiziert. Die Sialidase ist besonders vorteilhaft bei der Behandlung von Patienten, deren Krankheit durch eine veränderte Funktion der Granulozyten verursacht ist, wie z. B. bei der Sepsis. Die erfindungsgemäßen Konstrukte oder die erfindungsgemäßen humMAK können beispielsweise auch nach der Methode von Schwarz (Schwarz, A. & Steinsträsser, A. (1987), A novel approach to TC-99 labelled monoclonal antibodies. J. Nucl. Med., 28, 721) mit Tc-99m oder gemäß allgemein bekannten Methoden mit Re oder Y markiert werden. Die Markierung mit Tc-99m ist hierbei bevorzugt.

Die Erfindung schließt im allgemeinen auch jede beliebige andere Markierung mit Alpha-, Beta- oder Gamma-Strahlen ein. Die Verknüpfung der erfindungsgemäßen Sequenzen mit je nach Verwendung beliebigen Aminosäure-Resten kann entweder chemisch vorgenommen werden, oder mit Hilfe gentechnologischer Methoden, indem die erfindungsgemäße Sequenz bzw. die schweren oder leichten Ketten mit dem für das zu verknüpfende Molekül nach allgemein bekannten Verfahren chemisch oder gentechnisch verbunden werden. Die erfindungsgemäßen Sequenzen selbst können ebenso chemisch oder gentechnologisch hergestellt werden. Die erfindungsgemäßen Sequenzen selbst können ebenso chemisch oder gentechnologisch hergestellt werden. In dem Fall, daß der humMAK nicht aus einem intakten Antikörpermolekül besteht, sondern aus einem Fab oder F(ab')<sub>2</sub> Fragment, werden bei der Konstruktion der Gene für die schweren Ketten die mit der Entfernung des Fc Teils des Antikörpers verloren gegangenen 3' Regulationssequenzen (Stop Codon, 3' nichttranslatierter Bereich und poly-A Additionssignal) durch das C3 Exon, den 3' nicht-translatierten Bereich und das poly-A Additionssignal eines menschlichen MHC Klasse I Gens, vorzugsweise eines HLA B27 Gens, ersetzt. Die Herstellung der erfindungsgemäßen Sequenz kann wiederum entweder chemisch oder gentechnologisch nach für den Fachmann bekannten Verfahren erfolgen.

Für die gentechnologische Herstellung der erfindungsgemäßen Aminosäuresequenzen bzw. deren molekulare Konstrukte kann die Wirtszelle im allgemeinen mit zwei oder mehr Vektoren transfiziert werden. Der erste Vektor enthält beispielsweise ein Operon, das für ein von einer leichten Antikörperkette abgeleitetes Polypeptid kodiert und der zweite Vektor enthält beispielsweise ein Operon, das für ein von einer schweren Antikörperkette abgeleitetes Polypeptid kodiert. Vorzugsweise sind diese beiden Vektoren mit Ausnahme der für die leichten und schweren Ketten kodierenden Bereiche identisch, um eine möglichst gleich gute Expression der leichten und schweren Ketten zu gewährleisten. Die weiteren Vektoren enthalten im allgemeinen selektierbare Marker.

Alternativ kann für die Transfektion der Wirtszelle auch ein Vektor verwendet werden, welcher sowohl die für die leichte Kette kodierenden als auch die für die schwere Kette kodierenden DNA-Sequenzen enthält.

Die DNA Sequenzen, welche für die leichten und schweren Ketten kodieren, bestehen entweder aus genomischen Sequenzen oder aus cDNA Sequenzen oder aus einer Mischung von beiden. Vorzugsweise bestehen die genannten DNA Sequenzen zumindest teilweise aus genomischer DNA.

Die Wirtszelle, welche für die Expression des in dieser Erfindung beschriebenen humMAK verwendet wird, ist bevorzugt eine eukaryotische Zelle, im besonderen eine Säugerzelle, wie zum Beispiel eine BHK-Zelle, eine CHO-Zelle oder eine myeloide Zelle.

Weitere Gegenstände der vorliegenden Erfindung sind daher auch Klonierungs- und Expressionsvektoren und transfizierte Zellen. Zudem umfaßt die Erfindung therapeutische und diagnostische Formulierungen, die den erfindungsgemäßen humMAK enthalten und deren Herstellung sowie die Verwendung solcher Kompositionen in der Therapie und Diagnose von vorzugsweise Entzündungen und/oder in das Knochenmark metastasierenden Tumoren, insbesondere Mammakarzinom, Lymphom, Prostatakarzinom oder kleinzelliges Lungenkarzinom.

Die generellen Methoden, mit denen die Vektoren konstruiert werden können, die Transfektionstechnologie und die Zellkulturtechnologie sind dem Fachmann bekannt und zum Beispiel von Maniatis (Sambrook, Fritsch, Maniatis; Molecular Cloning, A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory, S. 11-44, 51-127, 133-134, 141, 146, 150-167, 170, 188-193, 197-199, 248-255, 270-294, 310-328, 364-401, 437-506 (1982); Sambrook, Fritsch, Maniatis; Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition; Cold Spring Harbor Press, S. 16.2-16.22, 16.30-16.40, 16.54-16.55 (1989) beschrieben.

Die vorliegende Erfindung wird nun anhand eines Beispiels näher beschrieben:

## Beispiel 1

Die V-Gen Sequenzen des Maus MAK BW 250/183 ist in EP-A1-388914 beschrieben (MAK A):

DE 42 25 853 A1

VH

5 Q V Q L Q E S G G G L V Q P G G S L R L  
CAGGTCCAAC TGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTTCTCTGAGACTC  
10 20 30 40 50 60

10 S C A T S G F S D Y Y M N W V R Q P P G  
TCCTGCGCAACTTCTGGGTTCACTGATTACTACATGAACTGGGTCCGCCAGCCTCCAGGA  
15 70 80 90 100 110 120

20 K A L E W L G F I S N K P N G H T T E Y  
AAAGCACTTGAGTGTTGGGTTTATTTC AAACAAACCTAATGGTCACACAACAGAGTAC  
130 140 150 160 170 180

25 S A S V K G R F T I S R D N S Q S I L Y.  
AGTGCATCTGTGAAGGGTCGGTTCACCATCTCCAGAGATAATTCCCAAAGCATCCTCTAT  
190 200 210 220 230 240

30 L Q M N T L R A E D S A T Y Y C A R D K  
CTTCAAATGAACACCCTGAGAGCTGAGGACAGTGCCACTTATTATTGTGCAAGAGATAAG  
35 250 260 270 280 290 300

40 G I R W Y F D V W G Q G T T V T V S S  
GGAATACGATGGTACTTCGATGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA  
310 320 330 340 350

DE 42 25 853 A1

VK

D I Q L T Q S P A I L S A S P G E K V T  
 GACATTGACGTGACCCAGTCTCCAGCAATCCTGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACA  
 10 20 30 40 50 60

M T C R A S S S V S Y M H W Y Q Q K P G  
 ATGACTTGACGGGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGA  
 70 80 90 100 110 120

S S P K P W I Y A T S N L A S G V P A R  
 TCCTCCCCCAAACCCCTGGATTATGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGC  
 130 140 150 160 170 180

F S G S G S G T S Y S L T I I R V W A E  
 TTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAAATCATCAGAGTGGAGGCTGAA  
 190 200 210 220 230 240

D A A T Y Y C Q Q W S S N P L T F G A G  
 GATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTGCGGTGCTGGG  
 250 260 270 280 290 300

T K L E I  
 ACCAAGCTGGAGATC  
 310

Als menschliche Empfänger V-Domänen wurden die Myelomproteine NEW (VH) und REI (VL) verwendet (Poljak, R.J., Ainsel, L.M., Chen, B.L., Phizackerley, R.P., Saul, F. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71 3440-3444; Palm, W., Hilschmann, N. (1973) Z. Physiol. Chem. 354, 1651-1654; Palm, W., Hilschmann, N. (1975) Z. Physiol. Chem. 356, 167-191). Beim Entwurf der Oligonukleotide für die Transplantation der CDR Regionen des MAK BW 250/183 auf die menschlichen Empfänger V-Domänen wurde, wie bei Riechmann, L., Michael Clark, Herman Waldmann, and Greg Winter beschrieben (Nature 332, 323-327, 1988), verfahren:

Die Humanisierung wurde nach der von L. Riechmann et al. und Güssow und Seemann beschriebenen Methode vorgenommen, wobei bei der schweren Kette zusätzlich zu den CDR Bereichen (Tramontano, A.; Chothia, C., Lesk, A.M. (1990) J. Mol. Biol. 215, 175-182) die Aminosäureposition 27 in NEW von Ser nach Phe verändert, die Aminosäurepositionen 28 NEW und 29 NEW deletiert und die Position 71 NEW von Val nach Arg verändert wurde.

Daraus resultieren folgende Oligonukleotide für die spezifische Mutagenese:

## DE 42 25 853 A1

250/183 V<sub>K</sub> CDR1:

5 5' CTG CTG GTA CCA GTG CAT GTA ACT TAC ACT TGA GCT  
GGC CCT ACA GGT GAT GGT 3'

10

250/183 V<sub>K</sub> CDR2:

15 5' GCT TGG CAC ACC AGA AGC CAG GTT GGA TGT GGC GTA  
GAT CAG CAG 3'

20

250/183 V<sub>K</sub> CDR3:

25 5' CCC TTG GCC GAA CGT GAG CGG GTT ACT ACT CCA CTG  
CTG GCA GTA GTA GGT 3'

30

250/183 V<sub>H</sub> CDR1:

35 5' CTG TCT CAC CCA GTT CAT GTA GTA ATC GCT GAA GCC  
AGA CAC GTT 3'

40

250/183 V<sub>H</sub> CDR2:

45 5' CTT GCT GGT GTC TCT GAG CAT TGT CAC TCT ACC CTT  
CAC GGA TGC GCT GTA CTC GGT TGT GTG TCC GTT AGG  
CTT GTT TGA AAT AAA TCC AAT CCA CTC 3'

50

250/183 V<sub>H</sub> CDR3:

55 5' GCC TGG ACC CCA GAC ATC GAA GTA CCA TCG TAT TCC  
CTT ATC TCT TGC ACA ATA 3'

60

Für die Mutagenesen wurden die V<sub>H</sub> und V<sub>K</sub> Gene des humanisierten anti Lysozym Antikörpers D1-3 (Verhoeven, M., Michael, Clark, Herman Waldmann, Greg Winter (1988), Nature 332, 323-327) verwendet. Daraus resultierten die in Tab. 1a und 1b dargestellten Sequenzen der ersten humanisierten Versionen der V<sub>H</sub> und V<sub>K</sub> Gene des MAk 250/183.

65



## DE 42 25 853 A1

Tabelle 1a:250 VH hum

CAG GTC CAA CTG CAG GAG AGC GGT CCA GGT CTT GTG AGA CCT AGC  
gln val gln leu gln glu ser gly pro gly leu val arg pro ser

5

CAG ACC CTG AGC CTG ACC TGC ACC GTG TCT GGC TTC AGC GAT TAC  
gln thr leu ser leu thr cys thr val ser gly phe ser asp tyr

10

TAC ATG AAC TGG GTG AGA CAG CCA CCT GGA CGA GGT CTT GAG TGG  
tyr met asn trp val arg gln pro pro gly arg gly leu glu trp

15

ATT GGA TTT ATT TCA AAC AAA CCT AAT GGT CAC ACA ACA GAG TAC  
ile gly phe ile ser asn lys pro asn gly his thr thr glu tyr

20

AGT GCA TCT GTG AAG GGT AGA GTG ACA ATG CTG CGA GAC ACC AGC  
ser ala ser val lys gly arg val thr met leu arg asp thr ser

25

AAG AAC CAG TTC AGC CTG AGA CTC AGC AGC GTG ACA GCC GCC GAC  
lys asn gln phe ser leu arg leu ser ser val thr ala ala asp

30

ACC GCG GTC TAT TAT TGT GCA AGA GAT AAG GGA ATA CGA TGG TAC  
thr ala val tyr tyr cys ala arg asp lys gly ile arg trp tyr

35

TTC GAT GTC TGG GGT CAA GGC AGC CTC GTC ACA GTC TCC TCA  
phe asp val trp gly gln gly ser leu val thr val ser ser

40

45

50

55

60

65

## DE 42 25 853 A1

Tabelle 1b:250 Vk hum

5 GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG AGC GCC AGC GTG  
asp ile gln met thr gln ser pro ser ser leu ser ala ser val

10 GGT GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT AGG GCC AGC TCA AGT GTA AGT  
gly asp arg val thr ile thr cys arg ala ser ser ser val ser

15 TAC ATG CAC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGT AAG GCT CCA AAG CTG  
tyr met his trp tyr gln gln lys pro gly lys ala pro lys leu

20 CTG ATC TAC GCC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGT GTG CCA AGC AGA  
leu ile tyr ala thr ser asn leu ala ser gly val pro ser arg

25 TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC ACC TTC ACC ATC AGC  
phe ser gly ser gly ser gly thr asp phe thr phe thr ile ser

30 AGC CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCC ACC TAC TAC TGC CAG CAG TGG  
ser leu gln pro glu asp ile ala thr tyr tyr cys gln gln trp

35 AGT AGT AAC CCG CTC ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC  
ser ser asn pro leu thr phe gly gln gly thr lys val glu ile

40 AAA CGT  
lys arg

45 Die humanisierten V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub> Gene wurden in Expressionsvektoren kloniert, welche das humane IgG3 Gen (DE-A1-38 25 615) und das humane C<sub>κ</sub> Gen (Hieter, p.A., Maizel, J.V., Leder, P. (1982), J. Biol. Chem. 257, 1516–1522; enthalten und zusammen mit geeigneten, Selektionsmarker-tragenden Plasmiden wie z.B. pRMH14 (Hudziak, R.M., Laski, F.A., RajBhandary, U.L., Sharp, P.A., Capecchi, M.R. (1982) Cell 31, 137–146) oder pSV2 dhfr (Lee, F., Mulligan, R., Berg, P., Ringold, G. (1981) Nature 294, 228) in Säugerzellen transfiziert

50 (Wirth, M., Bode, J., Zettlmeißl, G., Hauser, H. (1988) Gene 73, 419–426.

Die Charakterisierung dieser ersten Version des humanisierten Antikörpers (gemäß Beispiel 2) zeigte jedoch im Vergleich zum Maus MAκ stark reduzierte Affinität zum Antigen.

Bei einer erneuten Mutagenese der Aminosäuresequenzen wurde bei der V<sub>L</sub> Domäne zusätzlich zu den CDRs die Aminosäureposition REI 46 von Leu in Pro verändert. Daraus resultierte folgendes Oligonukleotid (250/183 V<sub>κ</sub> CDR2neu) für die Mutagenese des CDR2 der ersten Version des humanisierten 250/183 V<sub>κ</sub> Gens:

**250/183 V<sub>κ</sub> CDR2 neu:**

60 5' GCT TGG CAC ACC AGA AGC CAG GTT GGA TGT GGC GTA  
GAT CAG CGG CTT TGG AGC CTT 3'

65 Die aus dieser Mutagenese resultierende Sequenz der zweiten Version des humanisierten leichten Ketten V-Gens ist in Tabelle 1c dargestellt.

## DE 42 25 853 A1

Tabelle 1c:250 VK hum

GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG AGC GCC AGC GTG  
asp ile gln met thr gln ser pro ser ser leu ser ala ser val 5

GGT GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT AGG GCC AGC TCA AGT GTA AGT  
gly asp arg val thr ile thr cys arg ala ser ser ser val ser 10

TAC ATG CAC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGT AAG GCT CCA AAG CCG  
tyr met his trp tyr gln gln lys pro gly lys ala pro lys pro 15

CTG ATC TAC GCC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGT GTG CCA AGC AGA  
leu ile tyr ala thr ser asn leu ala ser gly val pro ser arg 20

TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC ACC TTC ACC ATC AGC  
phe ser gly ser gly ser gly thr asp phe thr phe thr ile. ser 25

AGC CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCC ACC TAC TAC TGC CAG CAG TGG  
ser leu gln pro glu asp ile ala thr tyr tyr cys gln gln trp 30

AGT AGT AAC CCG CTC ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC  
ser ser asn pro leu thr phe gly gln gly thr lys val glu ile 35

AAA CGT  
lys arg 40

## Beispiel 2

45

Immunologische Prüfung des BW 250/183 hum

Überstände von BHK Zellen, die mit den DNA-Konstrukten der zweiten Version des hum 250/183 transfiziert wurden, wurden auf humMAK Gehalt und Spezifität des humMAK geprüft.  
Hierzu wurden 2 verschiedene ELISA-Tests eingesetzt: 50

- a) ELISA zur Bestimmung der humanen IgG Konzentration
- b) Epitop-Kompetitions-ELISA auf Festphasenantigenen
- zu a) Der ELISA zur Bestimmung der humanen IgG Konzentration wurde entsprechend der bei Johansson et al. (J. Immunol. Methods 87, 7-11) beschriebenen Methode durchgeführt. 55

Als Festphasenantikörper wurde ein Ziege anti human IgG (Southern Biotechnology Associates (Best. Nr. 2040-01) 1 : 300 verdünnt. Als Nachweisantikörper diente ein alkalischer Phosphatase-markierter Ziege anti human kappa-Antikörper von der gleichen Firma (Best.Nr.: 2060-04), der mit einer Verdünnung von 1 : 250 eingesetzt wurden. 60

zu b) Der Epitop-Kompetitions-ELISA wurde ebenfalls wie bei Johansson et al. (s.o.) beschrieben durchgeführt. Allerdings wurden die Polystyrolplatten mit 75 µl CEA von einer Konzentration von 15 µg/ml gecoatet. Der Transfektomüberstand, der 200 ng/ml hum 250/183 enthielt, wurde mit gleichen Volumen verschiedener Konzentrationen (1 : 2 verdünnt) der murinen Kompetitoren versetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch für 20 Stunden bei Raumtemperatur auf die CEA-Festphase gegeben und der CEA-gebundene hum 250/183 mittels eines 1 : 250 verdünnten mit alkalischer Phosphatase markiertem Ziege anti human kappa-Antikörper (Best.Nr.: 2060-04) der Firma Southern Biotechnology Associates nachge- 65

## DE 42 25 853 A1

wiesen.

### Ergebnis

- 5 Mittels des ELISAs zum Nachweis von humanem IgG konnten Überstände von transfizierten BHK-Zellen gefunden werden, die  $\approx 200$  ng humanes IgG enthielten. Diese Überstände wurden dann in einem Epitop-Kompetitions-ELISA auf Spezifität geprüft.

Figure X zeigt, daß von den zur Konkurrenz im Überschuß eingesetzten murinen MAK nur der MAK BW 250/183 die Bindung des hum 250/183 an sein CEA-NCA95 spezifisches Epitop, welches auf der Festphase fixiert war, dosisabhängig inhibiert. Die MAK BW 431/26 und BW 374/14, die andere Epitope auf CEA erkennen (Bosslet, K., et al., Int. J. Cancer 36, 75-84, 1985; s. o.) beeinflussen die Bindung des hum 250/183 ebenso wenig wie der TF $\beta$ -spezifische MAK BW 494/32 (Bosslet, et al. Cancer Immunol. Immunother. 23, 185-189, 1986). Diese Daten zeigen, daß die Humanisierung des MAK BW 250/183 die Epitopspezifität nicht meßbar verändert hat, d. h. die Spezifität des hum 250/183 ist identisch mit der des Maus MAK BW 250/183.

### Patentansprüche

#### 1. Leichte Antikörperkette, enthaltend die Aminosäuresequenz

20 asp ile gln met thr gln ser pro ser ser leu ser ala ser  
val gly asp arg val thr ile thr cys arg ala ser ser ser  
val ser tyr met his trp tyr gln gln lys pro gly lys ala  
25 pro lys pro leu ile tyr ala thr ser asn leu ala ser gly  
val pro ser arg phe ser gly ser gly ser gly thr asp phe  
thr phe thr ile ser ser leu gln pro glu asp ile ala thr  
30 tyr tyr cys gln gln trp ser ser asn pro leu thr phe gly  
gln gly thr lys val glu ile lys arg

35 oder funktionell äquivalente Varianten davon.

#### 2. Schwere Antikörperkette, enthaltend die Aminosäuresequenz

40 gln val gln leu gln glu ser gly pro gly leu val arg pro  
ser gln thr leu ser leu thr cys thr val ser gly phe ser  
asp tyr tyr met asn trp val arg gln pro pro gly arg gly  
leu glu trp ile gly phe ile ser asn lys pro asn gly his  
45 thr thr glu tyr ser ala ser val lys gly arg val thr met  
leu arg asp thr ser lys asn gln phe ser leu arg leu ser  
ser val thr ala ala asp thr ala val tyr tyr cys ala arg  
50 asp lys gly ile arg trp tyr phe asp val trp gly gln gly  
ser leu val thr val ser ser

55 oder funktionell äquivalente Varianten davon.

3. Molekulares Konstrukt enthaltend die Sequenz nach Anspruch 1 und/oder 2 und weitere mit den genannten Sequenzen verknüpfte Aminosäureketten.

4. Molekulares Konstrukt nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die weiteren Aminosäureketten Teile eines humanen Antikörpers und verschieden von den Sequenzen gemäß Tabelle 1a oder 1c sind.

60 5. Molekulares Konstrukt nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Konstrukt ein single domain Fragment oder ein single chain Fragment ist.

6. Humanisierter Antikörper oder funktionell aktive Teile davon, dadurch gekennzeichnet, daß er eine leichte Antikörperkette nach Anspruch 1 und eine schwere Antikörperkette nach Anspruch 2 enthält.

65 7. Humanisierter Antikörper nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die funktionell aktiven Teile ein F(ab)- oder ein F(ab')<sub>2</sub>-Fragment mit einer oder mehreren Hinge-Regionen ist.

8. Molekulares Konstrukt nach mindestens einem der Ansprüche 3-5 oder humanisierter Antikörper nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß es markiert ist, vorzugsweise mit Tc-99m.

9. Molekulares Konstrukt nach mindestens einem der Ansprüche 3-5 oder humanisierter Antikörper nach

## DE 42 25 853 A1

Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß es mit einem Effektormolekül verbunden ist.

10. Molekulares Konstrukt oder humanisierter Antikörper nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Effektormolekül ein Enzym, ein Toxin, ein Chelatbildner und/oder eine weitere Antigenbindungsstelle, vorzugsweise mit katalytischer Aktivität ist.

11. Molekulares Konstrukt oder humanisierter Antikörper nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Effektormolekül Sialidaseaktivität besitzt.

12. Polynukleotid, das für die Antikörperkette nach Anspruch 1 oder 2 kodiert.

13. Polynukleotid mit der Sequenz

```

GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG AGC GCC AGC
GTG GGT GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT AGG GCC AGC TCA AGT
GTA AGT TAC ATG CAC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGT AAG GCT
CCA AAG CCG CTG ATC TAC GCC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGT
GTG CCA AGC AGA TTC AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC
ACC TTC ACC ATC AGC AGC CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCC ACC
TAC TAC TGC CAG CAG TGG AGT AGT AAC CCG CTC ACG TTC GGC
CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGT

```

kodierend für die leichte Antikörperkette oder

```

CAG GTC CAA CTG CAG GAG AGC GGT CCA GGT CTT GTG AGA CCT
AGC CAG ACC CTG AGC CTG ACC TGC ACC GTG TCT GGC TTC AGC
GAT TAC TAC ATG AAC TGG GTG AGA CAG CCA CCT GGA CGA GGT
CTT GAG TGG ATT GGA TTT ATT TCA AAC AAA CCT AAT GGT CAC
ACA ACA GAG TAC AGT GCA TCT GTG AAG GGT AGA GTG ACA ATG
CTG CGA GAC ACC AGC AAG AAC CAG TTC AGC CTG AGA CTC AGC
AGC GTG ACA GCC GCC GAC ACC GCG GTC TAT TAT TGT GCA AGA
GAT AAG GGA ATA CGA TGG TAC TTC GAT GTC TGG GGT CAA GGC
AGC CTC GTC ACA GTC TCC TCA

```

kodierend für die schwere Antikörperkette.

14. Vektor, enthaltend ein Polynukleotid nach Anspruch 12 oder 13.

15. Wirtszelle, enthaltend ein Polynukleotid nach Anspruch 12 oder 13 oder einen Vektor nach Anspruch 14.

16. Wirtszelle nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine BHK-, CHO- oder myeloide Zelle ist.

17. Verfahren zur Herstellung eines molekularen Konstrukts oder eines humanisierten Antikörpers nach mindestens einem der Ansprüche 3—11, dadurch gekennzeichnet, daß

- a) in einem Expressionsvektor ein Operon hergestellt wird, das ein Polynukleotid nach Anspruch 12 oder 13 enthält;
- b) der genannte Expressionsvektor in eine Wirtszelle eingebracht wird; und
- c) die Wirtszelle kultiviert; und
- d) das molekulare Konstrukt isoliert wird.

18. Verfahren zur Herstellung eines molekularen Konstrukts oder eines humanisierten Antikörpers nach mindestens einem der Ansprüche 3—11, dadurch gekennzeichnet, daß

- a) eine Wirtszelle nach Anspruch 15 oder 16 kultiviert und
- b) das molekulare Konstrukt isoliert wird.

19. Verwendung der molekularen Konstrukte oder humanisierten Antikörper nach mindestens einem der Ansprüche 3—11 zum Nachweis von Entzündungen und/oder zum Nachweis von in das Knochenmark metastasierenden Tumoren, vorzugsweise Mammakarzinom, Lymphom, Prostatakarzinom oder kleinzelliges Lungenkarzinom.

20. Verwendung der molekularen Konstrukte oder humanisierten Antikörper nach mindestens einem der Ansprüche 3—11 zur Herstellung eines Arzneimittels gegen Entzündungen und in das Knochenmark metastasierenden Tumoren, vorzugsweise Mammakarzinom, Lymphom, Prostatakarzinom oder kleinzelliges Lungenkarzinom.

21. Diagnostikum, enthaltend ein molekulares Konstrukt oder einen humanisierten Antikörper nach mindestens einem der Ansprüche 3—11.

## DE 42 25 853 A1

22. Arzneimittel, enthaltend ein molekulares Konstrukt oder einen humanisierten Antikörper nach mindestens einem der Ansprüche 3–11.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65